

红皮云杉外生菌根菌单接种及混合接种对苗木生长的影响

宋瑞清^{1,2}, 王 锋¹, 冀瑞卿¹, 祁金玉¹

(¹ 东北林业大学林学院 哈尔滨 150040)

(² 黑龙江省林业科学院 哈尔滨 150080)

摘 要 :以提高外生菌根真菌对红皮云杉苗木促生长效果为目的,在前期研究的基础上,采用菌株配对培养的方法对获得的云杉外生菌根真菌进行混合接种菌株组合筛选;采用沟施菌剂方法,对 3 年生红皮云杉移床苗进行外生菌根菌菌株组合野外混合接种试验,同时以各菌株野外单接种作为对照,研究外生菌根真菌单接种及混合接种对红皮云杉苗木生长的影响。试验结果表明:供试菌株及菌株组合对红皮云杉苗木生长均有一定的促进作用。菌株 L15 促生长效果最佳,接种 100d 苗木高生长高于对照 30.88%,地径高于对照 15.29%。组合 L15/025 与 L15/009 促苗木生长效果低于单接种 L15 的效果,高于单接种 009 和 025 的效果。接种菌株 010 和组合 L15/025 的苗木与对照相比,叶绿素含量提高差异显著,叶绿素 a 水平分别高于对照 59.15%、54.61%,叶绿素 b 水平分别高于对照 76.34%和 67.78%。除接种菌株 010 的苗木外,其他处理苗木其过氧化氢酶活性与对照相比均有所降低。所有处理苗木的根系活力均低于对照。综上,外生菌根菌高效菌株与一般菌株混合接种会弱化高效菌株自身接种效果;苗木过氧化氢酶活性、苗木根系活力与苗木的生物量间无相关性。

关键词 :红皮云杉苗木,外生菌根菌,单接种,混合接种,促生长效果

中图分类号 :Q939.9 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2007)06-1091-04

云杉是生外生菌根的树种,云杉的生长发育及林分更新必须依赖于外生菌根的存在,外生菌根对其在自然状态下的生存至关重要^[1,2]。森林群落的稳定,树木的更新、生长与外生菌根的类型及其多样性有着直接的关系^[3~7]。一般情况下,外生菌根性树种都能同时与多种外生菌根真菌发生共生关系,森林的组成树种能通过共有外生菌根真菌的共享,把各树种在时间和空间上紧密的联系在一起^[1,8]。菌根的多样性能使树木有效地利用资源,能使树木在更新阶段迅速地与现存的外生菌根真菌网络系统相联接,尽快形成菌根,在干扰的立地条件下,菌根的迅速形成对幼苗在不利的环境条件下的生存是非常重要的^[9~11]。

目前,国内有关云杉外生菌根方面的研究尚少,多数研究报告集中于外生菌根菌资源调查,有关外生菌根菌对红皮云杉苗木促生长的研究仅见本课题组的报道^[12],目前尚未见有关外生菌根真菌混合接种菌株组合筛选及云杉外生菌根菌野外混合接种的研究报道。

课题组 2000 年 8~10 月自大兴安岭新林林业局和兴隆林业局采集各种林型下的伞菌担子果,进行分离培养、纯化,获得 36 个菌株。经对红皮云杉室内接种试验获得 6 个可与红皮云杉共生形成外生菌根的菌株,综合菌根化苗木的苗高、地径、光合速率等指标,筛选出菌株 L15、菌株 009 和菌株

031 为具有潜在研究和应用价值的优良菌株。本研究是在上述研究的基础上,采用菌株配对培养的方法对获得的外生菌根真菌进行混合接种菌株组合筛选,将筛选出的优良菌株组合进行野外混合接种试验,同时以各菌株野外单接种作为对照,研究外生菌根真菌单接种及混合接种对红皮云杉苗木生长的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 :外生菌根真菌菌株采自大兴安岭新林林业局、兴隆林业局和平经营所的各种红皮云杉林下,经室内人工合成证明能与红皮云杉形成菌根的菌株,包括:009、010、025、L15、和 031(菌株学名将另文报道)。

1.1.2 培养基 :①改良 PD 液体培养基(配方为:马铃薯 200g,葡萄糖 20g,磷酸二氢钾 3g,硫酸镁 1.5g,维生素 B1 10mg,水 1000mL)。②改良 PDA(配方为:马铃薯 150~200g,葡萄糖 17~20g,琼脂 17~20g,柞树皮 5~10g,水 1000mL)。

1.2 红皮云杉外生菌根真菌菌种的扩大培养

用直径 6mm 的无菌打孔器,无菌条件下切取改良 PDA 平板上培养的外生菌根菌片,接种于盛有 250mL 液体培养基的三角瓶(500mL)中,每瓶接种 3 片。置 25℃、转速 120r/min

基金项目 :黑龙江省自然科学基金项目(C2004-06),哈尔滨市科技攻关项目(0012211080)

作者简介 :宋瑞清(1964-),女,黑龙江人,博士,教授,主要研究方向为菌物开发及利用、林木病理学及植物病害防治等。Tel :86-451-82190232, Fax :86-451-87500537, E-mail :songrq@public.hr.hl.cn, songrq1964@163.com

收稿日期 :2007-04-06,接受日期 :2007-06-29,修回日期 :2007-09-10

摇床上恒温水浴培养 15d,得到液体培养菌液。

1.3 外生菌根真菌混合接种菌株组合筛选

试验采用菌株配对培养的方法。在直径 9cm 的改良 PDA 平板培养基上 相距 3cm 分别接入直径 0.6cm 的 2 种外生菌根菌菌片,以菌株单独培养作为对照,置于 25℃ 恒温培养箱培养。按表 1 组成 10 个配对组合,每组合 3 个重复。定时测量菌落的纵横半径(共 4 个半径)采用两菌落趋向半

径进行生长测定^[13]。
被抑制率 = $\frac{[(\text{单独培养菌落半径}) - (\text{菌落趋向半径})](\text{单独培养菌落半径})}{(\text{单独培养菌落半径})} \times 100\%$

根据被抑制率选出最优组合。被抑制率为 0 时没有抑制,为次优组合,被抑制率小于 0 时没有抑制,并且有促进作用为最优组合,被抑制率大于 0 时有抑制。

表 1 混合菌株配对培养组合
Table 1 Pairing combinants

Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pairing strain 1	009	009	009	031	025	010	010	025	025	031
Pairing strain 2	025	010	L15	009	010	031	L15	031	L15	L15

1.4 外生菌根真菌野外接种

试验地设在延寿县林业苗圃。供试苗木为红皮云杉 3 年生移床苗。供试菌株为 009、010、025、031、L15 等 5 个外生菌根菌菌株,009/ L15、025/ L15 组合。2004 年 6 月 1 日,采用在苗间开沟施用液体培养的菌剂进行接种,每沟施用菌剂 200mL。每接种小区的面积 1m × 1m,隔离带宽 1m × 0.5m;苗床长 20m。对照区施用无菌培养液。每接种小区和对照区各设 3 个重复。

接种后的观测:在接种后的 100d,调查苗木的生长情况。采用对角线取样法,在接种区和对照区各选择 50 株苗木,测量苗高、地径后,冷藏,带回实验室进行根系活力、过氧化氢酶活性及叶绿素含量等指标的测定。

叶绿素含量测定采用分光光度计法,过氧化氢酶活性测定采用高锰酸钾滴定法,根系活力测定采用 TTC 法^[14,15]。利用 Spss 软件将各项指标测定结果进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 外生菌根真菌混合接种菌株组合筛选

根据 10 组配对菌株对峙培养结果(图 1),筛选出适合于混合接种的最优组合:009/L15(组合 3)、025/L15(组合 9)。配对组合 3 的对峙培养中,菌株 009 被抑制率为 0,而菌株 L15 被抑制率为负值,说明菌株 009 对菌株 L15 的生长有促进作用,配对组合 9 的对峙培养结果与组合 3 相似,菌株 L15

被抑制率为 0,菌株 025 被抑制率为负值,菌株 L15 对菌株 025 的生长有促进作用。在筛选出的 2 个配对组合中,一菌株的被抑制率为 0,而另一菌株被抑制率小于 0,它们类似于种群中的那种共居现象,即其中一种生物从中受益,而另一种不受影响^[13]。其余几组配对培养中两菌株之间均有不同程度的拮抗作用。

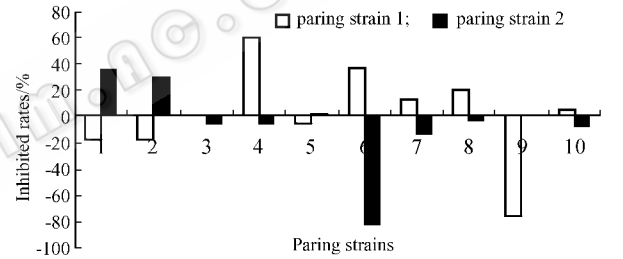


图 1 10 组外生菌根菌配对培养中各菌株的被抑制率
Fig.1 Inhibited-rates of 10 pairs of pairing strains.

2.2 外生菌根真菌野外接种

表 2 为各菌株及组合对红皮云杉苗木生长及生理指标的影响结果。表 3 为接种菌株 100d 苗木与对照相比各项指标增长情况。

从结果可看出:供试菌株中除菌株 009 外,其他菌株及组合对红皮云杉苗木高生长均有一定的促进作用。方差分析结果表明,除菌株 025 外,其他 3 菌株及 2 组合对苗木高生长促进作用显著。其中,菌株 L15 促苗木高生长作用最

表 2 接种各菌根菌菌株(组合)100d 的苗木各项生长及生理指标

Table 2 Growth index and physiological index of the seedlings which inoculated ectomycorrhizal fungi for 100d

Strains	Height/cm	Collar diameter/cm	Content of chlorophyll (mg/g)				Activity of hydrogen peroxidase [mL/(g·min)]	Root activity [g/(g·h)]
			C _a	C _b	C _{a+b}	C _{a/b}		
031	14.233 *	0.545	5.109	1.355	6.464	3.799	22.000	0.314
025	12.233	0.520	6.887	2.026	8.912	3.391	43.667	0.254
010	12.817 *	0.522	13.055 *	4.717 *	17.772 *	2.765	62.333	0.314
L15	14.767 *	0.573 *	5.782	1.985	7.767	2.929	27.667	0.283
009	11.200	0.511	6.989	2.090	9.079	3.361	29.500	0.384
L15/025	14.033 *	0.533	12.683 *	4.488 *	17.171 *	2.826	16.500	0.490
L15/009	13.917 *	0.562	6.257	1.775	8.031	3.515	21.833	0.399
CK	11.283	0.497	8.203	2.675	10.878	3.106	55.333	0.697

* most notable comparing with control under α=0.01. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

好,接种 100d 苗木其高生长比对照提高 30.88%;接种菌株 031、组合 L15/025 和 L15/009 的苗木其高生长均比对照提高 23% 以上。组合 L15/025 与 L15/009 接种 100d 苗木其高生长与对照相比提高 24.37% 和 23.34%,与单接种效果好的菌株(与对照相比差异显著的菌株)相比,其促高生长效果分别低于菌株 031 1.78% 和 2.81%、分别低于菌株 L15 6.51% 和 7.54%,分别高于菌株 010 10.97% 和 9.94%。从地径生长来看,供试菌株对苗木地径生长均有一定的促进作用。方差分析结果表明,菌株 L15 促苗木地径生长显著,接种 100d 苗木其地径生长与对照相比提高 15.29%。接种 L15/025 与 L15/009 的苗木与对照相比差异不显著,与单接种效果显著的菌株 L15 相比,接种苗木 100d 其地径生长分别降低 8.05% 和 2.21%。

接种菌株 010 和组合 L15/025 的苗木与对照相比,叶绿素含量提高差异显著。叶绿素 a 水平分别高于对照 59.15%、54.61%,叶绿素 b 水平分别高于对照 76.34% 和 67.78%。

除接种菌株 010 的苗木外,其他处理苗木其过氧化氢酶活性与对照相比均有所降低。所有处理苗木的根系活力均低于对照。

表 3 接种菌根菌的苗木各项指标的增长率(%)

Table 3 Growth increasing rate of the inoculated seedlings for 100 days compared with control(%)

Strains	Seedlings height	Seedlings collar diameter	Chlorophyll a	Chlorophyll b
031	26.15*	9.66		
025	8.42	4.63		
010	13.40*	5.03	59.15*	76.34*
L15	30.88*	15.29*		
009		2.82		
L15×025	24.37*	7.24	54.61*	67.78*
L15×009	23.34*	13.08		

* most notable comparing with control under $\alpha=0.01$.

3 结论和讨论

生活在一个群落中或生态系统中的各种微生物表现出多种不同的联系或相互作用,有些联系是中性的(neutralism),有些是互惠的(mutualism)或称正作用(positive interaction),有些则是有害的(harmful)或称负作用(negative interaction)^[13]。基于上述理论,应用于混合接种的外生菌根菌之间的关系不能存在负作用,正作用或中性的关系应该是应用的前提条件。本研究通过对外生菌根菌的室内配对培养来了解它们之间的相互作用关系,找出最佳组合,为外生菌根菌的混合接种提供理论依据。

通过红皮云杉外生菌根真菌单接种及混合接种对苗木生长的影响研究,得出以下结论:

(1)菌株 L15 为供试菌株中对红皮云杉促生长效果最佳的菌株。接种菌株 L15 100d 苗木高生长提高 30.88%,地径

生长提高 15.29%。菌株 031、010、L15/025、L15/009 亦可作为高效菌株应用于红皮云杉育苗中。此结果与前期研究结果^[12]一致。

(2)高效菌株与一般菌株混合接种会影响高效菌株自身接种效果。本研究中,组合 L15/025 与 L15/009 促苗木生长效果低于单接种 L15 的效果,高于单接种 009 和 025 的效果。因此,在应用外生菌根育苗时不应轻易采用菌株组合接种。

(3)苗木过氧化氢酶活性与苗木的生物量间无正相关。本研究中,除接种菌株 010 的苗木外,其他处理苗木其过氧化氢酶活性与对照相比均有所降低。但从生物量来看,接种外生菌根菌的苗木与对照苗木相比,均有不同程度增加。过氧化氢酶可以清除 H₂O₂,是植物体内重要的酶促防御系统之一,H₂O₂ 含量与植物的抗逆性密切相关^[14]。接种外生菌根菌株苗木氧化氢酶活性低,是否由于苗木体内 H₂O₂ 含量低有关,尚需进一步实验验证。

(4)苗木根系活力与苗木的生物量间无一定的相关性。本研究中,所有处理苗木的根系活力均低于对照,而接种外生菌根菌苗木的生物量与对照苗木相比均有所增加。

参 考 文 献

[1] 王 云. 外生菌根真菌(蘑菇、块菌)和动物、树木之间的相互关系. 陆地生态译报,1986,2:35-41.

[2] 王 云,谢支锡. 我国部分造林树种外生菌根真菌的初步调查. 真菌学报,1983,4(4):197-207.

[3] Molina R,Massicotte H,Trappe J M. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community ecological consequences and practical implications. In:Allen M F. Mycorrhizal Functioning. London:Chapman & hall. 1992.

[4] Newman E I. Mycorrhizal links between Plants their functioning and ecological significance. Advances in Ecological Research,1988,18:243-270.

[5] Perry D A, Margolis H, Choquette C *et al.* Ecotomycorrhizal mediation of competition between coniferous trees species. New Phytologist,1989,112:501-511.

[6] Perry D A, Margolis H, Amaranthus M P. Mycorrhizae, mycorrhizospheres, and reforestation: current knowledge and research needs. Canadian Journal of Forest Research,1987,17:929-940.

[7] Perry D A. Bootstrapping in Ecosystems. Bioscience,1989,39:230-237.

[8] Schoenberger M M, Perry D A. The effect of soil disturbance on growth and ecomycorrhizae of Douglas-fir and west hemlock seedlings: a greenhouse bioassay. Canadian Journal of Forest Research,1982,12:343-353.

[9] Smith S E, Read D J. Mycorrhizal Symbiosis. 2th edition. New

- [10] Trappe J M. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annual Review of Phytopathology*, 1977, **15**: 203 – 222.
- [11] Harley J L. The significance of Mycorrhiza. *Mycological Research*, 1989, **92**: 129 – 139.
- [12] 宋瑞清, 吴克. 红皮云杉外生菌根菌对苗木生长的影响. *微生物学报*, 2005, **6**: 910 – 914
- [13] 宋瑞清, 黄永青. 红松树栖真菌及引起的主要病害. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2001.
- [14] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物学生理实验指南. 第一版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [15] 王英典, 刘宁. 植物生物学实验指导. 第一版. 北京: 高等教育出版社, 2001.

Effect of ectomycorrhizal fungi on the seedlings growth of Korea spruce

SONG Rui-qing^{1, 2*}, WANG Feng¹, JI Rui-qing¹, QI Jin-yu¹

(¹ School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

(² Heilongjiang Academy of Forestry, Harbin 150080, China)

Abstract :To enhance the effects of ectomycorrhizal fungi to promote the growth of Korea spruce seedlings, based on previous research, the combinations of different ectomycorrhizal fungi strains were screened by dual culture method. 3 years transplanting seedlings of Korea spruce were inoculated by different combinations of ectomycorrhizal fungi strains using lister inoculating method in the field, and those were inoculated by different single strains were designed as control respectively. Thus the effects of different combinations and different single fungus strains to promote the growth of Korea spruces were studied. The results showed that all single strains and combinations in this experiment can promote the growth of Korea spruce seedlings. The growth characteristics of seedlings were observed 100 days after inoculation. The growth promoting effect of strain L15 was the best in all combinations and single strains. Comparing with control, the average height of seedlings inoculated by strain L15 was increased 30.88%, the average collar diameter of these was increased 15.29%. The growth promoting effect of combinations L15/025 or L15/009 were better than strain 009 or 025. Comparing with control, the leaf chlorophyll contents of seedling inoculated by strain 010 and combination L15/025 were increased significantly, the contents of chlorophyll a were increased 59.15% and 54.61% respectively, and the contents of chlorophyll b were increased 76.34% and 67.78% respectively. Except seedling inoculated by strain 010, the activities of hydrogen peroxidase of other treated seedlings were lower than one of control. The root activities of all treated seedlings were lower than one of control. In conclusion, inoculation by the mixture of high-effect strain and other single strain weakens the effect of high-effect strain to promote the growth of Korea spruce seedlings, the activity of hydrogen peroxidase and the root activity of seedling are not correlated with its biomass.

Keywords : seedlings of Korea Spruce ; ectomycorrhizal fungi ; single-inoculation ; mixed-inoculation ; growth-promoting effect